

L1 ANSWER 1 OF 2 CA COPYRIGHT 2000 ACS  
 AN 114:227760 CA  
 TI Protein promoter in fermented milk manufacture with Bifidobacterium  
 IN Hosoyama, Hiroshi; Osawa, Manabu; Hamano, Mitsutoshi  
 PA Kikkoman Corp., Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 4 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 IC ICM C12N001-38  
 ICS A23C009-123  
 CC 17-8 (Food and Feed Chemistry)  
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 03019686	A2	19910128	JP 1989-150631	19890615 <--
	JP 2589286	B2	19970312		
AB	Protein isolated from rice bran koji hydrolyzate is used as Bifidobacterium growth promoter in the manuf. of fermented milk with, e.g., B. longum ATCC 15707. Taste and flavor of the product were good. The protein promoted the fermn.				
ST	koji protein fermented milk manuf Bifidobacterium				
IT	Bifidobacterium longum				
	Bifidobacterium				
	(fermented milk manuf. with, koji protein as promoter in)				
IT	Proteins, biological studies				
	RL: BIOL (Biological study)				
	(from rice bran koji, as promoter in fermented milk manuf. with Bifidobacterium)				
IT	Milk preparations				
	(manuf. of, with Bifidobacterium, koji protein as promoter in)				
IT	Aspergillus oryzae				
	(protein from, as promoter in fermented milk manuf. with Bifidobacterium)				

**(54) AGENT FOR PROMOTING PROLIFERATION OF BIFIDUS BACTERIA AND PREPARATION OF FERMENTED MILK USING THE SAME**

(11) 3-19686 (A) (43) 28.1.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-150631 (22) 15.6.1989  
 (71) KIKKOMAN CORP (72) HIROSHI HOSOYAMA(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12N1/38, A23C9/123

**PURPOSE:** To improve the rate of proliferation of bifidus bacteria and to obtain a fermented product having sweet aroma by fractionating a decomposition liquid of rice bran malt to form a bifidus bacteria proliferation promoting agent containing a low molecular peptide fraction, mixing a milk raw material with the promoting agent and fermenting the obtained milk raw material with bifidus bacteria.

**CONSTITUTION:** Rice bran malt produced by culturing a mold in defatted rice bran, etc., is subjected to autodigestion to obtain an enzyme decomposition liquid (A). Ethanol having a concentration of 99.5% is added to the component A and the precipitate is further added with 90wt.% of ethanol and subjected to reprecipitation treatment to obtain a protein fraction (B). If necessary, the component A is filtered with an ultrafiltration membrane having a fractional molecular weight of 3,000-5,000 to obtain a low molecular peptide fraction (C). A bifidus bacteria proliferation-promoting agent containing the component B or C is added to fresh milk or reconstituted defatted milk in an amount of 0.05-0.5wt.% and a bifidus bacteria strain such as *Bifidobacterium longum* is inoculated to the milk and cultured at 30-40°C for 18-30hrs under anaerobic condition to effect the fermentation of the milk. After the fermentation, the product is optionally added with sugar, fruit juice, etc., to obtain the objective fermented milk.

**(54) PRODUCTION OF IMMOBILIZED ENZYME**

(11) 3-19687 (A) (43) 28.1.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-152214 (22) 16.6.1989  
 (71) KYORITSU YUKI CO LTD(1) (72) REIZO FUKUSHIMA(4)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12N11/10

**PURPOSE:** To obtain an immobilized enzyme having high activity and strength by impregnating an enzyme solution and a chitosan solution into a porous solid and reacting with a dialdehyde to crosslink the components.

**CONSTITUTION:** A porous solid (A) having particle diameter of 0.2-3mm and a pore volume of  $\geq 0.2\text{ml/g}$  is prepared from celite, diatomaceous earth, etc. Chitin is deacetylated to obtain a chitosan solution (B) which is dissociated into cation and made to be water-soluble in the presence of HCl, etc. A solution (C) of an enzyme such as amylase is mixed with the solution B to obtain an impregnation liquid (D) having a prescribed pH and a viscosity of  $\leq 100\text{cp}$ . The solid A is evacuated to remove air from the voids, immersed in the liquid D and then in a dialdehyde solution (E) such as glutaraldehyde. The objective immobilized enzyme is produced by carrying out crosslinking reaction of the above product under a pH and temperature condition not to inactivate the enzyme.

**(54) DNA SEQUENCE CODING PRINCIPAL SUBUNIT OF ATP SYNTHETASE ORIGINATED FROM METHANE BACTERIAL**

(11) 3-19689 (A) (43) 28.1.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-154891 (22) 16.6.1989  
 (71) MITSUBISHI ELECTRIC CORP (72) KENICHI INATOMI(1)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12N15/54//C12N15/54, C12R1/01

**PURPOSE:** To enable the synthesis of ATP in high efficiency by using a DNA sequence coding a principal subunit of ATP synthetase originated from methane bacteria.

**CONSTITUTION:** *Methanosarcina barkeri* (a kind of methane bacteria) is cultured in a medium containing yeast extract,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , etc., and the obtained bacterial cell is extracted to obtain a chromosome DNA (A). A fragment produced by the restriction enzyme treatment of the component A is linked with a fragment produced by the restriction enzyme treatment of a plasmid vector to obtain a recombinant DNA plasmid (B). The component B is introduced into *E. coli*, etc., and a gene bank (C) of methane bacteria is produced from the transformed *E. coli*. A transformant (D) containing a recombinant DNA coding ATP synthetase is selected from the component C using  $^{32}\text{P}$  as a label. The strain D is cultured on an agar medium, etc., and the obtained colony is extracted and purified to collect a DNA sequence coding principal subunits of ATP synthetase and containing an  $\alpha$ -subunit exhibiting an amino acid sequence of formula in the principal subunits.

```

10 20 30 40 50 60
MEVGEIYRV SPPVYATIGL GAETDLYEV GNEGLHGEVI QILGPKYLIQ VYKETAQIRP
70 80 90 100 110 120
GPPCVSTGSS LSVELGMILL STYIDVQVRP LHVLLERHOS FIRQVSDDO LNKELVDKFE
130 140 150 160 170 180
PIYKQDPSVH GGVIGVQGE TVNIEHILNV PPDISOTISD IESGHVYVVD TICTLYDOTE
190 200 210 220 230 240
FQHTQNPVR RIRPVEKALT PIRPLVTGHR ILGLDFPAK QUTAAIPQPF GSGKTVQOOS
250 260 270 280 290 300
LAAGSDTEIV VYIGGGERGH ENADVLESEP ELEDPTQDSF LHRTVLIAN TSNHPVARS
310 320 330 340 350 360
ASVLTGTEIA EYFRDMLDV SLNADTSBN AEAHREISSR LEENPOEGZY PAYLSARLAT
370 380 390 400 410 420
EAPADAES LGUFTGSEIV LGAVRPPQGD FSPVYQTEL RIVKVFALD AKISJEPHFP
430 440 450 460 470 480
NIMHLSYGL YKSLNDIAA ONYVADVPL RERANENLOT FSLQELVQI YGSDALPDNQ
490 500 510 520 530 540
QLALTFRLAL RYFIDQMAP HPYDVSPPD QQYKIKATH AKGDAABAL KSGVPVTEII
550 560 570 580
ALFSAVLEAK VATEKFEDES HNAVLAQDSE EFASLRCH

```

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-19686

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)1月28日

C 12 N 1/38  
A 23 C 9/123

6807-4B  
8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ビフィズス菌増殖促進剤及びこれを用いた発酵乳の製造法

⑯ 特 願 平1-150631

⑰ 出 願 平1(1989)6月15日

特許法第30条第1項適用 平成元年3月15日、社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 63巻3号」に発表

⑱ 発 明 者	細 山	浩	千葉県野田市宮崎101-2
⑱ 発 明 者	大 沢	学	千葉県野田市柳沢65-1
⑱ 発 明 者	浜 野	光 年	埼玉県北葛飾郡杉戸町清地1-9-15
⑲ 出 願 人	キッコーマン株式会社		千葉県野田市野田339番地

明 細 書

1. 発明の名称

ビフィズス菌増殖促進剤及びこれを用いた発酵乳の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 米糖澱分解液から分画した蛋白質画分を主成分とするビフィズス菌増殖促進剤。

(2) 米糖澱分解液から分画した低分子のペプチド画分を主成分とするビフィズス菌増殖促進剤。

(3) 請求項(1)又は(2)記載のビフィズス菌増殖促進剤を乳原料に添加し、これにビフィズス菌を接種して発酵させることを特徴とする発酵乳の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ビフィズス菌増殖促進剤及びこれを用いる発酵乳の製造法に係るものである。

(従来の技術)

腸内の有用菌であるビフィズス菌は牛乳あるいは

は還元脱脂乳中では増殖しにくく、十分な増殖をさせるためには増殖促進剤を添加する必要がある、この増殖促進剤については種々の提案がなされている。

例えば人参エキス本体の一部であるバンテチン、麦芽エキス、酵母エキス等であり、あるいは特開昭 81-282070に見られる如く、大豆蛋白質含有物質の分解物等である。

(発明が解決しようとする課題)

ビフィズス菌を利用して発酵乳等の食品を製造する場合、増殖促進剤に要求される性質は該物質が強い風味を持たず、しかも広範囲なビフィズス菌種に対して強い活性を有することである。

しかるに例えば、バンテチンは一部の菌種にしか効果を示さず、又、麦芽エキス、酵母エキス等は増殖促進効果が十分でない等の欠点がある。

本発明者等はビフィズス菌の増殖促進剤について種々検討を進めたところ、米糖澱の分解物が増殖促進効果を有することを見出し、先に特許出願した。

(課題を解決するための手段)

この米糠麹の分解物中の何がビフィズス菌の増殖促進に寄与しているのか、更に研究を進めたところ、寄与物質は分解物中蛋白質画分であり、就中、低分子のペプチド画分であること、そしてこの蛋白質画分あるいはペプチド画分は広範囲のビフィズス菌に対して増殖促進効果があり、しかも異味異臭が少ないことから発酵乳の製造に有効に利用可能であるという知見を得て、本発明を完成した。

即ち、本発明は米糠麹分解液から分画した蛋白質画分又は低分子のペプチド画分を主成分とするビフィズス菌増殖促進剤であり、また、これらの促進剤を乳原料に添加し、これにビフィズス菌を接種して発酵させる発酵乳の製造法である。

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明に於けるビフィズス菌増殖促進剤は米糠麹分解液から得られるが、米糠麹の米糠としては、通常米糠と称されるものならば何れを用いても良く、好ましくは予め米糠を脱脂処理して得られる

脱脂米糠を用いるのが培養効率の点で好ましい。

上記した米糠、好ましくは脱脂米糠に対し 40 ~ 70 % (V/W) 程度撒水し、これを 1 ~ 5 kg/cm<sup>2</sup>・G 程度で 5 ~ 120 分程度常法により加圧、加熱蒸煮した後、冷却し、これにアスペルギルス属、ムコール属、リゾプス属等の糸状菌を接種し、次いで 30 ~ 45 °C、30 ~ 80 時間程度、通常の製麹管理を行なって米糠麹を得る。

次いで米糠麹に、水、リン酸緩衝液、低濃度のアルコール含有水溶液等の水性溶液を 2 ~ 6 倍量 (W/W) 程度加え、前記米糠麹に含まれる糸状菌の産生する酵素により 4 ~ 10 時間程度、40 ~ 70 °C 程度、酵素分解 (自己消化) を行なうか、又は前記酵素分解の際、別に用意した酵素剤、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、グルタミナーゼ、ヌクレアーゼ、フィターゼ、フォスホリパーゼ等の群より選ばれる少なくとも 1 種以上の酵素剤を加え 4 ~ 15 時間程度、30 ~ 70 °C 程度の条件で分解し、米糠麹の酵素分解液を得る。

- 3 -

この酵素分解液より蛋白質画分を得るには、例えば、分解液に 99.5 % のエタノールを加え一夜放置し、不溶性の沈殿物を得、この沈殿物を少量の蒸留水に溶解し、この溶解液に 90 % のエタノールを加えて再度不溶性沈殿物を得、これを数回繰返すことによって得ることができる。

また酵素分解液より低分子のペプチド画分を得るには、例えば限外濾過法、逆浸透法、ゲル濾過法、吸着法等が挙げられ、具体的には限外濾過法ではダイヤフロメンブラン YM-5 (アミコン社)、ホローファイバースystem HIP-3 (アミコン社) 等の限外濾過膜で濾過する方法、ゲル濾過法ではセファデックス G-25 (ファルマシア社)、バイオゲル P-2 (バイオラッド社)、セルロフィン GCL-25 (生化学工業)、ダウエックス HW-50 (室町化学) 等の充填カラムを用いて分画する方法を挙げることができる。

限外濾過法を用いる場合には酵素分解液を分画分子量 3000 ~ 5000 の限外濾過膜で濾過し、低分子画分を得、これをエタノール沈殿法により沈

- 4 -

殿させればよく、ゲル濾過法による場合には酵素分解液にエタノールを添加して蛋白質を沈殿させ、この沈殿物の水溶液をゲルカラムで処理して低分子画分を得る。

次に、上記のビフィズス菌増殖促進剤を用いて発酵乳を製造する方法について説明する。

通常発酵乳の原料となる牛乳あるいは還元脱脂乳に増殖促進剤を 0.05 ~ 0.5 % 添加し、これに前培養したビフィズス菌を接種し、30 ~ 40 °C で 18 ~ 30 時間嫌気培養する。

ビフィズス菌は例えばビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ビフィダム等が好適な例として挙げられる。

発酵終了後、必要により糖、フレーバー、果汁等を添加して製品とする。

以下、実験例により本発明を具体的に示す。

実験例

市販の脱脂米糠 1 kg に 800 ml の水を撒水し、これを 1 kg/cm<sup>2</sup>・G、1 時間蒸煮、滅菌した後冷却し、これに麹菌としてアスペルギルス・オ

- 5 -

- 506 -

- 6 -

リゼー 460 (FERM BP-983) のフスマ培養物 10 g (胞子数:  $1.6 \times 10^8$  個/g) を接種し、37 ~ 40 °C で 40 時間製麹し、米麹麹を得た。

次いでこの米麹麹に、3 倍量の蒸留水を加え、50 °C で 4 時間攪拌しつつ酵素分解を行なって分解液を得た。

この分解液 100 ml に 99.5 % エタノール 900 ml を加え一夜静置後、不溶性沈殿物を得、これを少量の水に溶解し、更に 90 % のエタノールを加え不溶性沈殿物を得た。この操作を 6 回繰返して得た蛋白質画分を凍結乾燥して、ビフィズス菌増殖促進剤を得た。また分解物を限外濾過膜（ローファイバーシステム HIP-3 (アミコン社製、分画分子量 3000) で濾過し、濾液 300 ml を得た。

この濾液に 99.5 % エタノール 2700 ml を加え一夜静置後、不溶性画分を得た。この不溶性画分を少量の蒸留水に溶解し、90 % エタノールによる分画を合計 6 回繰返したところ、茶褐色の不溶性画分が得られ、これを凍結乾燥して 4.3 g の乾燥したビフィズス菌増殖促進剤を得た。(総

窒素 13 %)

これらの促進剤を 10 ml の 10 % 還元脱脂乳に 0.1 % 添加し、更に予めブリックスリバー培地で 24 時間、液体培養したビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC 15707 を 0.05 ml (初発菌数:  $1.2 \times 10^8$  /ml) 添加し、37 °C で 24 時間嫌気培養してビフィズス菌含有発酵乳を得た。

対照として増殖促進剤無添加のもの(対照 1)、麦芽エキスを 0.1 % 添加したもの(対照 2)、酵母エキスを 0.1 % 添加したもの(対照 3)、を上記と同条件で発酵させ発酵乳を得た。

得られた発酵乳を 10 名のパネルにより下記評点で官能テストを実施した。

- 2 風味良好
- 3 風味やや良好
- 0 風味普通
- 1 風味やや悪い
- 2 風味悪い

これらの結果を第 1 表に示す。

- 7 -

第 1 表

添加物	生菌数 (個/ml)	※ 増加酸度	※※ 官能評価
対照 1 無添加	$5.8 \times 10^8$	1.00	-0.3
対照 2 麦芽エキス	$7.2 \times 10^8$	2.05	0.5 発酵臭強い
対照 3 酵母エキス	$9.8 \times 10^8$	4.72	-0.4 酵母臭強い
本発明 (1) (蛋白質画分)	$8.5 \times 10^8$	3.95	0.3 甘い芳香
本発明 (2) (ペプチド画分)	$1.7 \times 10^7$	8.32	1.1 甘い芳香

※ 増加酸度: 試料 10 ml を水で 2 倍に希釈し、0.1 N -NaOH で pH 7.0 までに滴定し、対照 1 の滴定量を 1.00 にした場合の各試料滴定量の比で示した。

※※ 官能評価: 10 名のパネルの評点の平均値。

- 9 -

- 8 -

第 1 表に示す結果から明らかなように、本発明によるビフィズス菌増殖促進剤は増殖に顕著な効果があり、また得られる製品も甘い芳香を有する優れた発酵乳である。

(実施例)

以下に実施例を示す。

実施例 1

脱脂米糠 (築野株式会社製) 300 g に 240 ml の水を撒水し、これを蒸煮缶で 1 kg/cm<sup>2</sup>・G、30 分間蒸煮、殺菌し冷却後、麹菌としてアスペルギルス・オリゼー 460 (FERM BP-983) のフスマ培養物 3 g (胞子数:  $1.6 \times 10^8$  個/g) を接種し、37 ~ 40 °C で 40 時間製麹して、米麹麹を得た。

次いでこの米麹麹の全量に、3 倍量の 1 % リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、45 °C で 5 時間攪拌しつつ酵素分解した。

この分解液 100 ml に 99.5 % エタノール 900 ml を加え一夜静置後、不溶性沈殿物を得、この不溶性沈殿物を少量の蒸留水に溶解し、この溶解液

に 90 % のエタノールを加えて再度不溶性沈殿物を得た。この操作を 7 回繰返し、得られた不溶性沈殿物を凍結乾燥して米 麹酵素分解液の蛋白質成分を主成分とするビフィズス菌増殖促進剤を得た。(総窒素 13 %)

## 実施例 2

実施例 1 と同様にして得た凍結乾燥前の不溶性沈殿物を水に溶解し、これをセルロファイン GCL-25m (生化学工業製) が充填されたカラム (27mm × 300 mm) を用いて分子量 2000 以下の区分を分画した。この区分を濃縮後凍結乾燥してビフィズス菌増殖促進剤を得た。このものはニンヒドリン反応陽性で加水分解により数種のアミノ酸から成るペプチドであることが確認された。(総窒素 13 %、糖 0.13 %)

## 実施例 3

還元脱脂乳の 10 % 水溶液に実施例 1 又は実施例 2 で得られたビフィズス菌増殖促進剤を 0.1 % 宛添加し、更に予めブリックスリバー培地で 20 時間、液体培養したビフィドバクテリウム・

ロンガム ATCC 15707 を 5 ml 添加し、37 °C で 24 時間培養したところビフィズス菌がそれぞれ  $2.5 \times 10^8$  個/ml 及び  $1.6 \times 10^7$  個/ml と多量に含有する発酵乳が得られた。

特許出願人 キッコーマン株式会社

- 11 -

手続補正書 (自発)

平成 2 年 1 月 17 日

特 許 庁 長 官 殿

## 1. 特許出願の表示

平成 1 年特許願第 150631 号

## 2. 発明の名称

ビフィズス菌増殖促進剤及びこれを用いた発酵乳の製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 千葉県野田市野田 3 3 9 番地

名 称 (447) キッコーマン株式会社

取締役社長 中野孝三郎

## 4. 補正命令の日付

目 発

## 5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

方式  
審査

- 1 -



- 508 -

- 12 -

## 6. 補正の内容

(1) 明細書第 2 頁上から 7 行目の「大豆」を「大麦」と補正します。

(2) 明細書第 4 頁上から 2~3 行目の「好ましくは……微水し」を「好ましくは脱脂米糠に対し、含有水分が 40~70 % (V/V) 程度になるように微水し」と補正します。

(3) 明細書第 7 頁上から 2 行目の「 $1.6 \times 10^8$  個/g」を「 $1.6 \times 10^8$  個/g」と補正します。

(4) 明細書第 8 頁下から 5 行目の「3 風味やや良好」を「1 風味やや良好」と補正します。

(5) 明細書第 12 頁上から 1 行目の「5 ml 添加し」を「初発菌数が  $1.2 \times 10^8$  個/ml になる様に添加し」と補正します。

特許出願人 キッコーマン株式会社

- 2 -